

TRANSMITTAL LETTER
(General - Patent Pending)

gfw
Docket No.
112701-545

In Re Application Of: **Hajjaj et al.**

Application No.	Filing Date	Examiner	Customer No.	Group Art Unit	Confirmation No.
10/629,823	July 30, 2003	K. Srivastava	29157	1651	7287

Title:
CHOLESTEROL-LOWERING AGENT

COMMISSIONER FOR PATENTS:

Transmitted herewith is:

**Submission of Certified Copy of Priority Document (1 page);
Certified Copy of EP 01102218.3; and
Return Receipt Postcard**

in the above identified application.

- ☒ No additional fee is required.
- ☐ A check in the amount of _____ is attached.
- ☒ The Director is hereby authorized to charge and credit Deposit Account No. _____ as described below.
- ☐ Charge the amount of _____
- ☒ Credit any overpayment.
- ☒ Charge any additional fee required.
- ☐ Payment by credit card. Form PTO-2038 is attached.

WARNING: Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.



Signature

Dated: April 5, 2005

**Robert M. Barrett (30,142)
Bell, Boyd & Lloyd LLC
P.O. Box 1135
Chicago, IL 60690-1135**

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the "Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450" [37 CFR 1.8(a)] on
April 5, 2005

(Date)


Signature of Person Mailing Correspondence

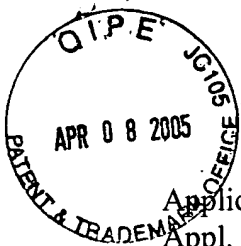
Heather Foster

Typed or Printed Name of Person Mailing Correspondence

CC:



THIS PAGE BLANK (USPTO)



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Hajjaj et al.
Appl. No.: 10/629,823
Filed: July 30, 2003
Conf. No.: 7287
Title: CHOLESTEROL-LOWERING AGENT
Art Unit: 1651
Examiner: K. Srivastava
Docket No.: 112701-545

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Applicants are respectfully enclosing the certified copy of the priority document for which priority is claimed for the above-identified application under 35 U.S.C. §119. Specifically, the document enclosed is:

<u>Document No.</u>	<u>Country</u>	<u>Date</u>
01102218.3	Europe	January 31, 2001

Respectfully submitted,

BELL, BOYD & LLOYD LLC

BY 

Robert M. Barrett
Reg. No. 30,142
P.O. Box 1135
Chicago, Illinois 60690-1135
Phone: (312) 807-4204

Dated: April 5, 2005



THIS PAGE BLANK (USPIC)

6884



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

01102218.3

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

C. v.d. Aa-Jansen

MÜNCHEN, DEN
MUNICH,
MUNICH, LE

22/02/05

THIS PAGE BLANK (USPTO)





Anmeldung Nr:
Application no.: 01102218.3
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 31.01.01
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
Case postale 353
1800 Vevey
SUISSE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Agent Hypcholestérolémiant

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

/00.00.00/

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

A61K35/84

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 1 -

AGENT HYPOCHOLESTEROLEMIANT

La présente invention concerne un agent hypcholestérolémiant issu de champignons comestibles.

5

Actuellement les considérations nutritionnelles des consommateurs poussent les industriels de l'alimentation à proposer des aliments présentant des fonctionnalités nutritionnelles améliorées.

10

Il est reconnu qu'un taux élevé de cholestérol sérique est un facteur non négligeable de risque athéroscléreux. Ainsi, la diminution de ce taux de cholestérol sérique est un moyen de lutte contre le risque de maladies cardiovasculaires. Sachant que la majeure partie du cholestérol circulant est issue d'une synthèse de novo, l'inhibition de la biosynthèse de cholestérol endogène apparaît comme une

15

voie intéressante de traitement, ou de prévention de l'hypercholestérolémie.

20

La biosynthèse du cholestérol comprend trois étapes majeures. La première, la condensation, permet de passer de trois acétyl-CoA au mévalonate. Cette condensation implique la participation, entre autres, de la 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA-reductase (HMGCoA-reductase). Le

25

mévalonate ainsi formé est ensuite polymérisé en squalène via des intermédiaires polyisoprène. Enfin, le squalène mène au cholestérol par cyclisation/déméthylation via la formation d'intermédiaires réactionnels, entre autres le lanostérol et ses dérivés.

30

Différents composés sont utilisés pour inhiber la synthèse du cholestérol. Les statines, en particulier, agissent très en amont, par inhibition de HMGCoA-reductase.

- 2 -

La lovastatine, isolée et purifiée à partir de divers champignons et/ou moisissures a été mise à profit comme agent hypocholestérolémiant sous forme de médicament ou de complément nutritionnel. Ainsi DE 4402591 décrit la production et l'isolement de lovastatine et d'acide mevinolinique de *Pleurotus ostreatus*, ainsi que l'utilisation de ces composés pour inhiber la biosynthèse du cholestérol. L'utilisation de lovastatine nécessite cependant un isolement ainsi qu'une purification avant son emploi. D'autre part, les composés de la classe des statines, inhibiteurs de HMGCoA-reductase induisent des effets secondaires indésirables. En effet l'HMGCoA-reductase est une enzyme qui agit très en amont dans la voie de la chaîne de biosynthèse du cholestérol (transformation de l'HMGCoA en mévalonate), dès lors son inhibition tend à modifier la synthèse d'autres composés dérivés du mévalonate. Ainsi, en supprimant la production de mévalonate, on observe une diminution de la synthèse de divers stéroïdes, hormones, de co-enzyme Q10, d'isopentenyl ARNt, de dérivés isoprenoïdes ou de dolichol par exemple. La déplétion de tels métabolites est responsable, entre autres, de troubles hépatiques et musculaires via une augmentation du taux de transaminases hépatiques, par exemple (Hiyoshi et al, J. of Lipid Research, 2000, (41) 1136-1141).

Dans cette optique, on a cherché des composés capables d'inhiber les étapes terminales de la chaîne de synthèse du cholestérol pour éviter les problèmes inhérents aux inhibiteurs de HMGCoA-reductase. Divers composés de synthèse, inhibiteurs des étapes terminales de déméthylation du lanostérol en 14 déméthyl-lanostérol,

- 3 -

existent. Ces composés sont pour la plupart des dérivés oxygénés de stérols.

Cependant, tous ces inhibiteurs sont des purs produits de synthèse chimique, tels ceux décrits dans WO9113903. Ainsi, outre le fait que leur fabrication passe par une synthèse chimique longue, complexe et onéreuse, ces composés entrent dans la classe des médicaments, ce qui implique des études cliniques pour homologation, enregistrement et autorisation.

Komoda et al (Chem. Pharm. Bull., 1989 37(2) 531-533) décrivent des dérivés de lanostérol oxygénés obtenus par modification chimique d'acide Ganodérique isolé de *Ganoderma lucidum*. Il est indiqué dans ce document que seul les dérivés modifiés par voie chimique présentent une action hypocholestérolémiant. L'acide ganodérique B ainsi que son dérivé ester, servant à l'obtention des divers autres dérivés, ne présentent pas d'activité inhibitrice sur la synthèse du cholestérol.

Différents champignons sont décrits pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes. Ainsi KR 9303886 décrit la préparation d'aliments hypocholestérolémiants à partir de champignons médicinaux par séchage, pulvérisation, extraction à l'eau bouillante et concentration. Il apparaît que de tels extraits agissent au niveau de HMGCoA-réductase (Bobek et al, Casopis Lebaru Ceskych, 1997 136(6) 186-190 ; Bobek et al, Experientia, 1995 51(6) 589-591). DE 4402591, mentionné plus haut, suggère aussi que certains champignons comestibles sont riches en inhibiteurs de HMGCoA-réductase.

Le but de la présente invention est de fournir un agent hypocholestérolémiant, non issu de synthèse chimique et utilisable dans un produit alimentaire, agissant sur les

- 4 -

étapes terminales de la chaîne de biosynthèse du cholestérol.

5 A cette fin, l'agent hypocholestérolémiant selon la présente invention comprend des dérivés naturels de lanostérol oxygénés issus de champignons comestibles.

10 Par « agent hypocholestérolémiant », on entend un agent qui inhibe la synthèse du cholestérol et plus particulièrement en agissant sur les étapes terminales de la chaîne de biosynthèse du cholestérol, et ceci grâce à son contenu en dérivés naturels de lanostérol oxygénés.

15 Par « dérivés naturels » on entend des composés qui n'ont subi aucune modification chimique par quelque moyen que ce soit. Il s'agit des dérivés de lanostérol oxygénés obtenus directement à partir des champignons comestibles.

20 De même, par « champignons comestibles », on entend, des champignons avec une longue tradition de consommation alimentaire. On entend ainsi tant des champignons ni toxiques ni vénéneux, qui se distinguent ou non par leurs qualités gustatives et/ou aromatiques. Il peut s'agir par exemple des champignons choisis dans le groupe comprenant les ordres de classification suivants : Agaricales, Aphyllophorales et Stereales. De manière préférentielle, il peut s'agir de champignons choisis dans le groupe
25 comprenant : *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus eous*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus citrinopileatus* et *Flamulina velutipes*.

30 L'invention concerne aussi l'utilisation dans un produit alimentaire d'un agent hypocholestérolémiant

- 5 -

comprenant des dérivés naturels de lanostérol oxygénés
issus de champignons comestibles.

Enfin, le procédé de préparation de l'agent
5 hypocholestérolémiant selon la présente invention comprend
les étapes suivantes :

- macération d'un champignon comestible dans un
premier solvant,
- séparation des phases solides et liquides,
- 10 - évaporation de la phase liquide jusqu'à obtention
d'un extrait sec,
- reprise de l'extrait sec avec de l'eau,
- extraction de la phase aqueuse à l'aide d'un second
solvant de polarité inférieure au premier solvant et non-
15 miscible avec l'eau et
- séparation des phases aqueuse et organique.

L'extrait organique ainsi obtenu après élimination de
la phase aqueuse représente l'agent hypocholestérolémiant
20 riche en dérivés de lanostérol naturels oxygénés et est
utilisé pour les évaluations *in vitro*, les fractionnements
et purifications.

L'étape de macération peut être précédée d'une étape
de broyage et s'effectuer avec du champignon frais ou
25 séché. Cette macération peut s'effectuer à température
ambiante ou à une température de réfrigération. Selon la
température de macération choisie, cette dernière
s'effectuera sur une durée plus ou moins longue. L'étape de
macération peut ainsi s'étaler sur une durée pouvant être
30 comprise entre 6 et 72 heures. Le premier solvant utilisé
pour cette macération peut être du méthanol, de l'éthanol

ou du chloroforme, par exemple, utilisés seuls ou en mélange.

La séparation des phases solide et liquide peut être réalisée par filtration sur papier ou sur gaze, par centrifugation ou par décantation, par exemple.

Après évaporation de la phase liquide, de préférence à une température proche de la température ambiante, l'extrait sec obtenu peut être repris avec une quantité d'eau comprise entre 5 et 100 % (v/v) par rapport à la quantité de premier solvant utilisé pour la macération. De manière à faciliter l'extraction avec le second solvant, on peut ajuster le pH de cette solution aqueuse ainsi obtenue à une valeur de pH acide, c'est à dire à une valeur comprise entre 2 et 4, par exemple, avant l'extraction à l'aide du second solvant. Cette acidification peut être réalisée à l'aide d'acide chlorhydrique, par exemple.

La solution aqueuse ainsi obtenue peut être soumise à une extraction à l'aide d'un second solvant non miscible avec l'eau et de polarité inférieure au premier tel que de l'acétate d'éthyle, de l'isopropanol ou du chloroforme par exemple, volume à volume. Le deuxième solvant sera choisi selon ce double critère de polarité inférieure au premier solvant et de non-miscibilité avec l'eau. Dans le cas particulier de l'utilisation possible du chloroforme comme premier solvant, par exemple, celui-ci ne constituera pas le deuxième solvant et ce second solvant sera choisi de polarité inférieure au chloroforme et non miscible avec l'eau. Une telle extraction peut être réalisée plusieurs fois consécutivement, par exemple. La phase organique peut être récupérée par décantation, par exemple, et évaporée, de préférence sous vide à une température de l'ordre de 25 à 35 °C. Avant cette étape d'évaporation, la phase

- 7 -

organique peut éventuellement être séchée, par exemple à l'aide de Na_2SO_4 anhydre.

5 Ainsi, une fois la phase organique complètement évaporée on obtient un extrait sous forme pulvérulente riche en dérivés de lanostérol naturels oxygénés. Un tel extrait peut être additionné dans un produit alimentaire, par exemple.

10 Dans le présent contexte, l'effet hypocholestérolémiant du présent produit est estimé de manière qualitative sur le modèle de cellules hépatiques humaines T9A4 en culture *in vitro*. Bien que l'on sache que de tels résultats ne sont pas directement transférables *in vivo* à l'homme, ils n'en fournissent pas moins des indications utiles. L'effet hypocholestérolémiant est
15 estimé par la mesure de la synthèse *de novo* de cholestérol sur des cellules hépatiques humaines en culture en mesurant l'incorporation d'acétate- C^{14} . Un mode d'évaluation de cette synthèse *de novo* est décrit dans une méthode présentée ci-après.

20 L'agent obtenu après extraction à partir de champignon peut être purifié, fractionné, analysé et caractérisé par chromatographie liquide et gazeuse, spectroscopie de masse et résonance magnétique nucléaire de manière à identifier les dérivés de lanostérol oxygénés contenus. Les matériels
25 et les méthodes mis en œuvre pour une telle caractérisation sont décrits en détail dans des méthodes présentées ci-après.

Analyse *in vitro* de l'effet hypocholestérolémiant

30

Les cellules hépatiques humaines T9A4 sont mises en croissance sur le milieu LCM (Biofluids, Rockville, MD) à

- 8 -

37°C sous 3,5% CO₂. Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de cultures à 24 puits et incubées jusqu'à confluence avec 1 mM acétate C¹⁴ (1 mCi/mol, Amersham) pendant 20 heures en l'absence (contrôle) ou en présence de l'extrait riche en dérivés de lanostérol oxygénés issus de champignons et/ou de fractions purifiées, dissout dans le méthanol.

Une extraction de lipides est réalisée par incubation dans un mélange hexane:isopropanol (3:2) pendant 30 minutes à température ambiante. L'extrait est ensuite séché sous azote puis redissout dans de l'hexane et soumis à une chromatographie haute performance en couche mince (Merck, Darmstadt, Allemagne) avec comme solvant un mélange hexane :diethyl ether:acide acétique (75:25:1). La neo-synthèse de cholestérol est déterminée en mesurant l'incorporation de l'acétate C¹⁴ au sein du cholestérol à l'aide d'un imageur (Camberra Packard, Zurich, Suisse) et exprimée en % du contrôle.

Les résultats sont présentés dans le tableau 1. ID₅₀ représente la dose inhibant la synthèse de cholestérol de 50%. On peut noter que les différents extraits présentent une activité hypocholestérolémiant notable. De plus, les extraits obtenus avec *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus citrinopileatus* et *Flamulina velutipes* montrent une activité très forte avec un seuil d'inhibition 50% de l'ordre de 1 à moins de 14 µg/ml.

Les extraits bruts actifs de *Ganoderma lucidum* et de *Pleurotus citrinopileatus* ont été purifiés et testés pour leur activités hypocholestérolémiant. Les résultats sont présentés au tableau 2. On peut constater que l'extrait brut obtenu à partir de *Ganoderma lucidum* contient lui-même

- 9 -

une grande quantité de composés hypocholestérolémiants dont la dose inhibant 50 % de la biosynthèse du cholestérol est inférieure à 3 µg/ml. L'inhibition observée avec les fractions purifiées à partir de *Pleurotus ostreatus* présentent un ID50 plus élevée mais cependant particulièrement intéressante.

Caractérisation physico-chimique des composés contenus dans les extraits de champignons.

10

Spectrométrie de masse

HPLC/SM (chromatographie liquide haute performance / spectrométrie de masse)

Les analyses ont été réalisées en utilisant soit un spectromètre de masse Micromass AutoSpec OA-TOF connecté à un système HPLC Waters 2690 ou un spectromètre de masse Finnigan TSQ-700 triple quadrupole connecté à un système HPLC Waters consistant en un autosampler 757, une pompe 600-MS et un détecteur UV 486-MS. La colonne HPLC utilisée est une Nucléosil 100 5-C18 (250 x 4 mm, Macherey Nagel). Le solvant A utilisé est de l'eau contenant 0,1 % d'acide tri-fluoro-acétique (TFA), le solvant B est de l'acétonitrile contenant 0,1% TFA. Le débit est fixé à 1 ml/min. L'élution est réalisée en mode isochratique (10% A, 90% B) ou à l'aide d'un gradient linéaire de 90% A / 10% B vers 10% A / 90% B en 25 minutes suivi de 5 minutes avec 10% A / 90% B. Une post colonne de dérivation permet de diriger le mélange à un débit de 0,1 ml/min vers les spectromètres de masse. Ces derniers fonctionnent avec un électrospray fixé à 4 kV. Les spectres de masse sont acquis entre 100 et 800 Da en mode positif.

- 10 -

CG/SM (Chromatographie gazeuse / Spectroscopie de masse)

Analyses réalisées à l'aide d'un chromatographe gaz HP 5890 CG combiné à un spectromètre de masse Finnigan MAT 8430. Le capillaire de silice utilisé est un J&W Sci DB-5 (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm d'épaisseur du film). Le gaz utilisé est de l'Hélium à une pression de 150 kPa. Le programme de température est de 60°C (1 min), 30°C/min jusqu'à 270°C puis 10°C/min jusqu'à 320°C. L'injecteur est chauffé à 250°C. Les spectres de masse sont obtenus en mode EI à 70 eV de 20 à 800 Da. Les échantillons sont injectés avant et après triméthylsilyl derivatisation réalisée à l'aide d'un mélange de pyridine et de BSTFA (1/3, v/v) à 100°C pendant 1h.

15 RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

Les spectres sont obtenus à l'aide d'un spectromètre Bruker DPX-360 à température ambiante. Fréquence de proton 360,12 MHz, fréquence ¹³C 90,56 MHz. Techniques appliquées pour la RMN du proton : spectroscopie une dimension, spectroscopie de corrélation homonucléaire 2D, spectroscopie nucléaire Overhauser 2 D. Pour la RMN du ¹³C : spectroscopie une dimension avec et sans découplage du proton, spectroscopie de corrélation hétéronucléaire 2D avec détection de la fréquence des ¹³C. Les molécules sont dissoutes dans CDCl₃ 99,8%.

EXEMPLE 130 Préparation d'un extrait à partir de *Pleurotus eryngii*.

5 grammes de fruit séché de *Pleurotus eryngii* sont broyé et mis à macérer dans 50 ml de méthanol à 80 % pendant 1 jour

- 11 -

à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré sur papier et le filtrat récolté, évaporé. L'extrait brut est repris avec de l'eau distillée (50 ml) et le pH est ajusté à 3 à l'aide d'acide chlorhydrique 2N. Cet extrait aqueux est extrait en deux fois avec de l'acétate d'éthyle, volume à volume. La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre et évaporée sous vide, à 30 °C, pour enlever le solvant. L'extrait ainsi obtenu, environ 100 mg, est repris dans 4 ml de méthanol.

EXEMPLE 2

Préparation d'un extrait à partir de *Pleurotus eous*.

La même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 est utilisée, à la différence que l'on obtient, in fine, environ 170 mg d'extrait à partir de 4.5 g de champignon séché.

EXEMPLE 3

Préparation d'un extrait à partir de *Ganoderma lucidum*.

La même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 est utilisée, à la différence que l'on met à macérer 6 g de champignon et que l'on obtient, in fine, environ 140 mg d'extrait.

EXEMPLE 4

Préparation d'un extrait à partir de *Grifola frondosa*.

- 12 -

La même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 est utilisée, à la différence que l'on met à macérer 6,8 g de champignon et que l'on obtient, in fine, environ 180 mg d'extrait.

5

EXEMPLE 5

Préparation d'un extrait à partir de *Pleurotus ostreatus*.

10 La même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 est utilisée, à la différence que l'on obtient, in fine, environ 120 mg d'extrait à partir de 4 g de champignon séché.

EXEMPLE 6

15

Préparation d'un extrait à partir de *Agrocybe aegerita*.

20 La même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 est utilisée, à la différence que l'on met à macérer 6,5 g de champignon et que l'on obtient, in fine, environ 290 mg d'extrait.

EXEMPLE 7

Préparation d'un extrait à partir de *Pholiota nameko*.

25 La même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 est utilisée, à la différence que l'on obtient, in fine, environ 310 mg d'extrait à partir de 4 g de champignon séché.

30

- 13 -

EXEMPLE 8

Préparation d'un extrait à partir de *Pleurotus citrinopileatus*.

- 5 La même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 est utilisée, à la différence que l'on met à macérer 7 g de champignon et que l'on obtient, in fine, environ 160 mg d'extrait.

10 EXEMPLE 9

Préparation d'un extrait à partir de *Flamulina velutipes*.

- 15 La même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 est utilisée, à la différence que l'on met à macérer 2.6 g de champignon et que l'on obtient, in fine, environ 140 mg d'extrait.

EXEMPLE 10

- 20 Fractionnement et caractérisation physico-chimique des composés contenus dans les extraits de champignon *Ganoderma lucidum*.

- 25 Ceux-ci ont été choisis car les extraits bruts obtenus présentent une forte activité hypocholestérolémiante in vitro.

- 30 200 g de champignon sec *Ganoderma lucidum* sont broyés et macérés dans 2 litres de méthanol 80%, à température ambiante pendant 2 jours. Le mélange est filtré sur gaze et la phase liquide évaporée sous vide, à 30°C. L'extrait méthanolique obtenu (env. 12 g) est repris avec 100 ml

- 14 -

d'eau et le pH de cette solution est ajusté à 3 à l'aide d'acide chlorhydrique 2 N. Cet extrait aqueux est extrait 3 fois volume à volume avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 anhydre et évaporée sous vide, à 30°C, pour éliminer le solvant. L'extrait sec obtenu (6,7 g) est repris à l'aide d'un mélange éther de pétrole et méthanol 90%. L'extrait méthanolique obtenu (6,5 g) est chromatographié sur un gel de silice ; l'élution est réalisée par paliers avec 100% CHCl_3 , puis 1% MeOH dans CHCl_3 , puis 10% MeOH dans CHCl_3 , puis 100% MeOH. La fraction 100% CHCl_3 est rechromatographiée sur gel de silice ; l'élution est effectuée par paliers avec 100% hexane, puis 5% acétate d'éthyle dans l'hexane, puis 20% acétate d'éthyle dans l'hexane, puis 50% acétate d'éthyle dans l'hexane, puis 100% acétate d'éthyle. Les fractions actives 20% acétate d'éthyle dans l'hexane, 50% acétate d'éthyle dans l'hexane et 100% acétate d'éthyle sont purifiées par chromatographie liquide haute performance (HPLC). A cette fin, une colonne Nucleosil 100-5 C18 (250 x 4 mm, Macherey Nagel) est utilisée avec une post-colonne Lichrospher 100 RP-18 (Merck). La phase mobile consiste en un mélange de 0,05% H_3PO_4 dans eau/acétonitrile (10/90) v/v. L'élution chromatographique est réalisée en mode isocratique avec un débit de 1 ml/min. Le détecteur utilisé est un Hewlett Packard G1315A, série 1100 et λ_{max} est fixée à 254 nm. Les molécules actives sont identifiées par Spectroscopie de Masse (SM) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

- 15 -

EXEMPLE 11

Fractionnement et caractérisation physico-chimique des composés contenus dans les extraits de champignon *Pleurotus citrinopileatus*.

Ceux-ci ont été choisis car les extraits bruts obtenus présentent une forte activité hypocholestérolémiante *in vitro*.

200 g de champignon sec *Pleurotus citrinopileatus* sont broyés et macérés dans 2 litres de méthanol 80%, à température ambiante pendant 2 jours. Le mélange est filtré sur gaze et la phase liquide évaporée sous vide, à 30°C. L'extrait méthanolique obtenu (env. 31 g) est repris avec 100 ml d'eau et le pH de cette solution est ajusté à 3 à l'aide d'acide chlorhydrique 2 N. Cet extrait aqueux est extrait 3 fois volume à volume avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre et évaporée sous vide, à 30°C, pour éliminer le solvant. L'extrait acétate d'éthyle (6,6 g) est chromatographié sur un gel de silice ; l'élution est réalisée par paliers avec 100% CHCl₃, puis 5% MeOH dans CHCl₃, puis 10% MeOH dans CHCl₃, puis 100% MeOH. La fraction 100% CHCl₃ est rechromatographiée sur gel de silice ; l'élution est effectuée par paliers avec 100% hexane, puis 5% acétate d'éthyle dans l'hexane, puis 20% acétate d'éthyle dans l'hexane, puis 50% acétate d'éthyle dans l'hexane, puis 100% acétate d'éthyle. Les fractions actives 20% acétate d'éthyle dans l'hexane, 50% acétate d'éthyle dans l'hexane et 100% acétate d'éthyle sont purifiées par chromatographie liquide haute performance (HPLC). A cette fin, une colonne Nucleosil 100-5 C18 (250 x 4 mm, Macherey Nagel) est

- 16 -

utilisée avec une post-colonne Lichrospher 100 RP-18 (Merck). La phase mobile consiste en un mélange de 0,05% H_3PO_4 dans eau/acétonitrile (10/90) v/v. Le débit est de 1 ml/min. Le détecteur utilisé est un Hewlett Packard G1315A, série 1100 et λ_{max} est fixée à 254 nm.

Les molécules actives sont identifiées par spectroscopie de masse couplée à une chromatographie en phase gazeuse CG/SM.

10 Le tableau 3 met en évidence les dérivés naturels de lanostérols oxygénés (oxylanostérols) identifiés dans différentes fractions purifiées à partir de *Ganoderma lucidum* et à partir de *Pleurotus citrinopileatus*. En ce qui concerne *Ganoderma lucidum*, les analyses de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées avec les fractions 80% Hexane / 20% Acétate d'éthyle et 50% hexane / 50% acétate d'éthyle (telles qu'indiquées au tableau 2). En ce qui concerne *Pleurotus citrinopileatus*, seule la fraction 80% hexane / 20% acétate d'éthyle a été utilisée. Les figures 1 et 2 mettent en évidence le Ganoderol A identifié par RMN et spectrométrie de masse, dans les fractions purifiées de *Ganoderma lucidum* (80/20 et 50/50 Hexane/Acétate d'éthyle) et de *Pleurotus citrinopileatus* (80/20 Hexane/Acétate d'éthyle).

25

30

- 17 -

5 Tableau 1 : Activité hypocholestérolémiante *in vitro* observée sur cellules hépatiques humaines avec les extraits obtenus à partir de champignons comestibles.

	Champignons	ID ₅₀ (µg/ml)
	<i>Pleurotus eryngii</i>	>150
	<i>Pleurotus eous</i>	>70
10	<i>Ganoderma lucidum</i>	1
	<i>Grifola frondosa</i>	180
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	150
	<i>Agrocybe aegerita</i>	>150
	<i>Pholiota nameko</i>	>300
15	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	10
	<i>Flamunila velutipes</i>	<14

20

25

- 18 -

Tableau 2 : Activité hypocholestérolémiant *in vitro* observée sur cellules hépatiques humaines avec les fractions purifiées des extraits obtenus à partir des champignons comestibles *Ganoderma lucidum* et *Pleurotus citrinopileatus*.

	Fractions	ID ₅₀ (µg/ml)
<i>Ganoderma lucidum</i>		
	100% CHCl ₃	
10	95% Hexane-5% Acétate d'éthyle	>17
	80%Hexane-20% Acétate d'éthyle	3
	50%Hexane-50% Acétate d'éthyle	0.8
	100% Acétate d'éthyle	1.5
	95% CHCl ₃ -5% MeOH	1.3
15	90% CHCl ₃ -10% MeOH	2.4
	100% MeOH	>2
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>		
	100% CHCl ₃	
20	95% Hexane-5% Acétate d'éthyle	>16
	80% Hexane-20% Acétate d'éthyle	7.5
	50% Hexane-50% Acétate d'éthyle	5
	100% Acétate d'éthyle	2.5
	95% CHCl ₃ -5% MeOH	15
25	90% CHCl ₃ -10% MeOH	>60
	100% MeOH	>55

5 Tableau 3 : Activité hypocholestérolémiant *in vitro* observée sur cellules hépatiques humaines avec les principales molécules d'oxylanostérol purifiées des extraits obtenus à partir des champignons comestibles *Ganoderma lucidum* et *Pleurotus citrinopileatus*.

	<u>Oxylanosterols</u>	Masse (m/z)	ID ₅₀ (µg/ml)
10	^a Ganoderol A	438	1
	^b Ganoderol A	436	7
	^b Ganoderol B	440	10
	^b acide Ganodérique Y	454	0.5

^a molécule présente dans *Ganoderma lucidum* et *Pleurotus citrinopileatus*

^b molécule présente juste *Ganoderma lucidum*.

- 20 -

REVENDICATIONS

1. Agent hypocholestérolémiant riche en dérivés de
5 lanostérol naturels oxygénés isolés de champignons
comestibles.
2. Agent hypocholestérolémiant selon la revendication 1,
caractérisé en que les champignons sont choisis dans le
10 groupe comprenant les ordres de classification :
Agaricales, Aphyllophorales et Stereales.
3. Agent hypocholestérolémiant selon les revendications 1
et 2, caractérisé en ce que les champignons sont choisis
15 dans le groupe comprenant : *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus*
ecous, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus*
ostreatus, *Agrocybe aegerita*, *Pholiota namako*, *Pleurotus*
citrinopileatus et *Flamulina velutipes*.
- 20 4. Utilisation dans un produit alimentaire, d'un agent
hypocholestérolémiant selon les revendications 1 à 3.
5. Procédé de préparation d'un agent hypocholestérolémiant
selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :
25 - macération d'un champignon comestible dans un
premier solvant,
- séparation des phases solides et liquides,
- évaporation de la phase liquide jusqu'à obtention
d'un extrait sec,
30 - reprise de l'extrait sec avec de l'eau,

- 21 -

- extraction de la phase aqueuse à l'aide d'un second solvant de polarité inférieure au premier solvant et non miscible avec l'eau et

- séparation des phases aqueuse et organique.

5

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le premier solvant est choisi dans le groupe comprenant le méthanol, l'éthanol et le chloroforme, utilisé seuls ou en mélange.

10

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le deuxième solvant est choisi dans le groupe comprenant l'acétate d'éthyle, l'isopropanol et le chloroforme, utilisés seuls ou en mélange.

15

8. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'étape de macération est réalisée pendant 4 à 96 heures à une température comprise entre 5 et 30 °C.

20

9. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'on ajuste le pH de la phase aqueuse à une valeur comprise entre 2 et 5 avant l'extraction à l'aide du second solvant.

25

- 22 -

ABREGE**Agent hypocholestérolémiant**

5 La présente invention concerne un agent hypocholestérolémiant riche en dérivés naturels de lanostérol oxygénés issus de champignons comestibles. Un tel agent peut être additionné à des produits alimentaires. Procédé de fabrication d'un tel agent.

10

Identification of Ganoderol A by ^1H NMR

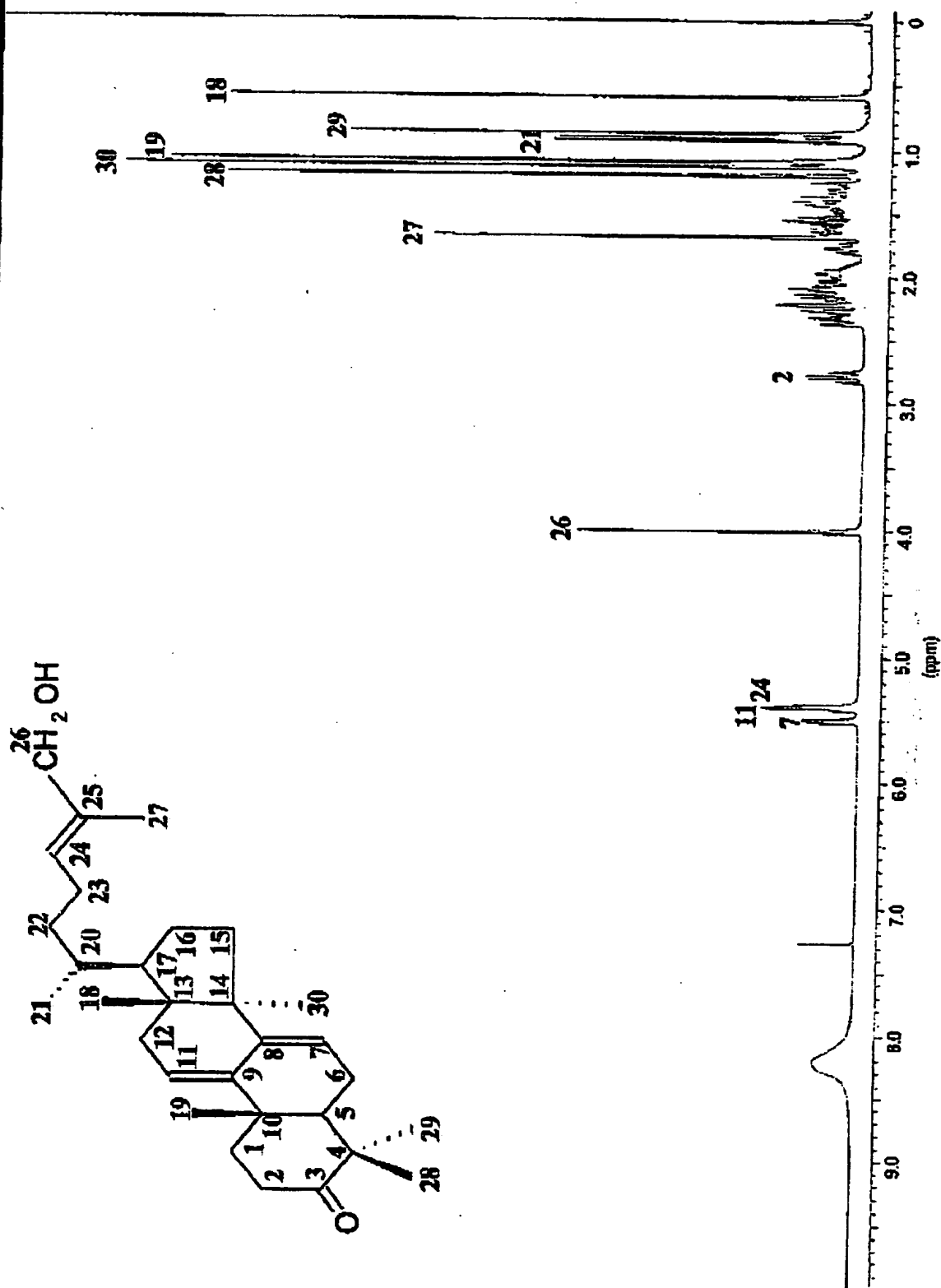


Fig: 1

Identification of Ganoderol A by ^{13}C NMR

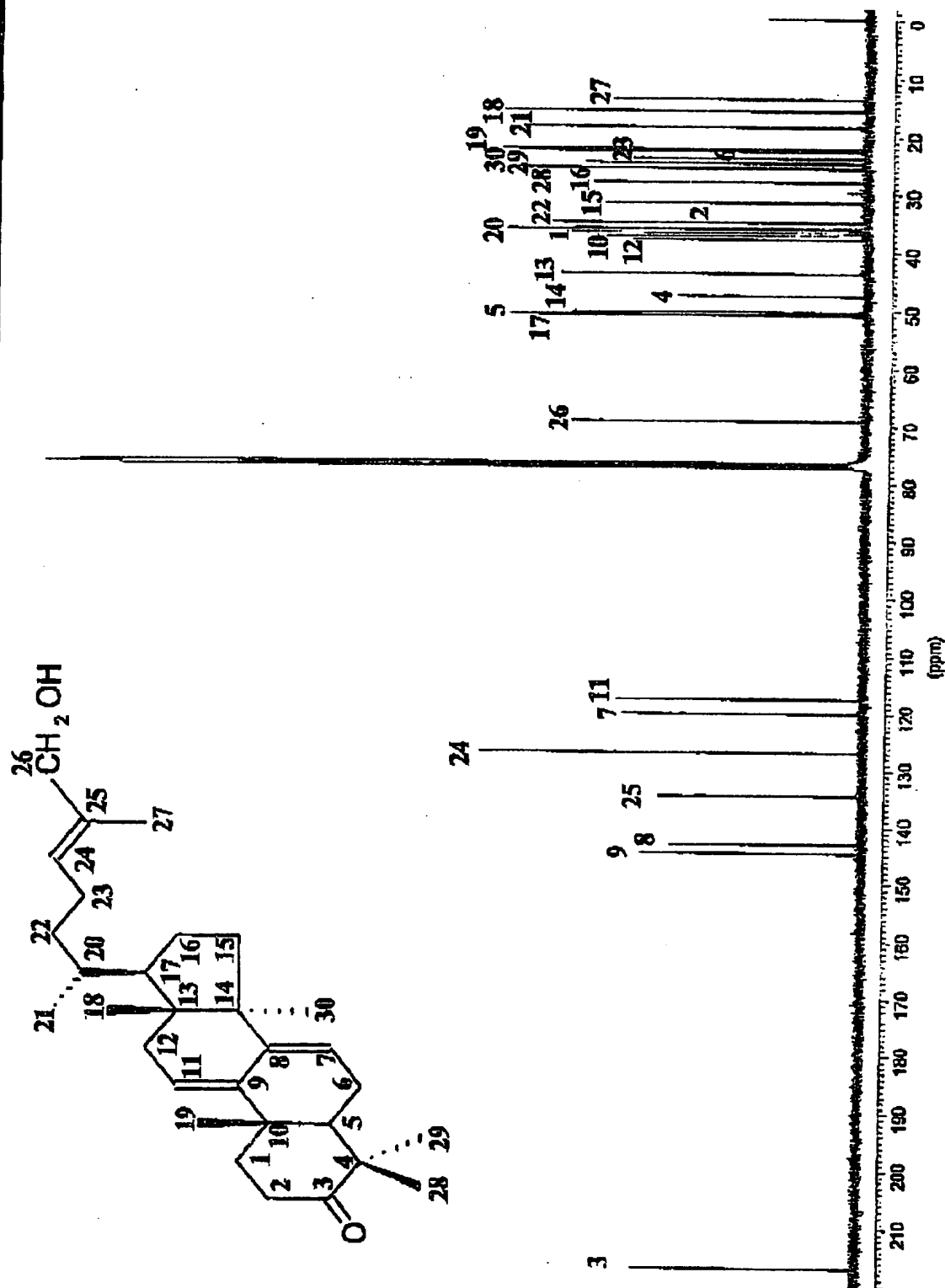


Fig: 2